

B9

FREEZE-DRIED VACCINE FOR HEPATITIS A

Patent number: JP1279843
Publication date: 1989-11-10
Inventor: MORITSUGU YASUO; others: 04
Applicant: YASUO MORITSUGU; others: 03
Classification:
- international: A61K39/29; A61K9/14; A61K47/00
- european:
Application number: JP19880106749 19880428
Priority number(s):

Abstract of JP1279843

PURPOSE: To obtain the subject vaccine resistant to the lowering of titer, having excellent storage stability and quickly soluble in use, by purifying a virus obtained by tissue culture, inactivating the product and freeze-drying in the presence of a stabilizing agent.

CONSTITUTION: A large amount of hepatitis virus A (HAV) is produced by the tissue culture using (A) GL-37 cell capable of highly producing HAV and established from the cultured kidney cell of African green monkey by cloning using a colony culture method and (B) an HAV strain KRM 003 strain separated from the feces of hepatitis A patient and having excellent sensitivity to the above cell. The obtained HAV is highly purified, inactivated, added with a stabilizing agent and freeze-dried. The stabilizing agent is 0.1-2.0% (W/V) of an amino acid such as glycine, alanine or lysine or their salt, 0.1-15% of sugars such as glucose, lactose or mannitol and 0.01-0.1% of a gelatinizing agent such as gelatin or human albumin.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A) 平1-279843

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)11月10日

A 61 K 39/29
9/14
47/00

3 1 6

8829-4C
D-7417-4C
J-7417-4C

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全5頁)

⑭ 発明の名称 凍結乾燥A型肝炎ワクチン

⑮ 特 願 昭63-106749

⑯ 出 願 昭63(1988)4月28日

特許法第30条第1項適用 昭和62年11月5日、「第35回日本ウイルス学会総会」において文書をもって発表

⑰ 発 明 者 森 次 保 雄 東京都八王子市台町1-14-23
 ⑰ 発 明 者 戸 塚 敦 子 東京都昭島市玉川町5-16-2-107
 ⑱ 出 願 人 森 次 保 雄 東京都八王子市台町1-14-23
 ⑱ 出 願 人 デンカ生研株式会社 東京都中央区日本橋兜町12-1 大洋ビル
 ⑱ 出 願 人 千 葉 県 千葉県千葉市市場町1丁目1番地
 ⑱ 出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地
 ⑲ 代 理 人 弁理士 筒 井 知
 最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

凍結乾燥A型肝炎ワクチン

2. 特許請求の範囲

- (1)組織培養により得られたウイルス液を精製し、不活化した製品に安定化剤を添加し、凍結乾燥して得られるA型肝炎ワクチンの凍結乾燥製剤。
 (2)安定化剤としてアミノ酸またはその塩、及び糖類を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。
 (3)安定化剤としてアミノ酸またはその塩、糖類及び膠質剤を添加する特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。
 (4)アミノ酸またはその塩が、グリシン、アラニン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン及びリジンから選ばれる少なくとも1種である特許請求の範囲第(2)項記載の製剤。
 (5)糖類がグルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトース、ラクトース、マルトース、サッカロース、マンニット、ソルビット及びキシリットから選ばれる少なくとも1種である特許請求の範囲

第(1)項記載の製剤。

- (6)膠質剤がゼラチン、ヒトアルブミンまたはデキストランである特許請求の範囲第(3)項記載の製剤
 3. 発明の詳細な説明

本発明は、A型肝炎ワクチンの凍結乾燥製剤に関する。さらに詳しくは、組織培養法により得られたウイルスを精製し、不活化後、安定化剤の存在下で凍結乾燥を行うことを特徴とするA型肝炎ワクチンの凍結乾燥製剤を提供するものである。

発明の背景

A型肝炎は、A型肝炎ウイルス(以下、HAVと略称する)によって起こり、疫学的にも、臨床的にも非常に重要な感染症であり、いまだ有効な治療対策が見い出されていない。そのため、このようなA型肝炎に対してもっぱら予防法が検討されており、現在はグロブリン製剤を2-3カ月おきに投与することが行われている。しかし、グロブリン製剤中の抗HAV抗体力価の低下の問題や頻回投与の必要性のため、ワクチンの開発が望まれてきたが、まだ実用化されるまでには至っていない。

ところで、A型肝炎ワクチンは、HAVの常在地域への渡航者の感染を防止する効果を有していると共に、世界中いたるところで起こる散发性A型肝炎の二次感染を防止する効果を有している。これらの背景から、A型肝炎ワクチン製剤は日本国内はもとより、広く世界各地において使用可能であることが必要である。すなわち、安定性がすぐれ、長期保存に充分に耐え得る製剤の提供は必須の条件である。

本発明者らは、A型肝炎患者の糞便より樹立されたHAV KRM003株とHAV感受性細胞を用いた組織培養によるウイルスを原料としてワクチンの開発を試みてきた。(第33回日本ウイルス学会抄録 257頁、(1985))

通常、液状ワクチンには防腐剤が加えられており、一般的には広い抗菌スペクトルを有するチメロサルが加えられている。ところが、本発明者らはワクチン開発中に、精製HAV抗原にチメロサルを加えるとHAV抗原活性が低下する現象を見出した。(第35回日本ウイルス学会抄録 234頁、

(1987))さらに、あらかじめ精製HAV抗原にエチレンジアミン四酢酸(以下、EDTAと略称する)を加えておくと抗原活性の低下が抑えられることより、前述の現象はチメロサル中の2価の水銀イオンに起因するものと考えられた。しかしながら、EDTA添加はある程度効果は認められるものの完全ではなく、また、EDTAの添加は注射時に痛みを伴うことより、該EDTAを含まない凍結乾燥製剤が好ましいと考えられた。しかし、通常の液状製剤にみられるような条件下でそのまま凍結乾燥を行うと、乾燥の過程において力価が低下する欠点が生じることが判明した。

発明の目的

本発明者らは、上記のような問題点を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、抗原力価の低下や性状の悪化を伴わずに凍結乾燥することを可能ならしめ、かつ乾燥品の保存安定性も液状製剤に比して格段に良好となる凍結乾燥の条件と、安定化のための製剤の配合組成とを見い出すことにより本発明を完成した。

発明の構成および効果

本発明に用いるA型肝炎ウイルスは、組織培養より得られたウイルスが使用される。HAVは長い間培養細胞で増殖出来なかったが、1979年に至りようやくProvostとHilleman(Provost, P. J. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 160, 213, (1979))による初の成功が報告された。彼らはムネアカハラタマリンを使ってHAVの継代を行い、肝臓から抽出したウイルスをムネアカハラタマリンの肝臓の培養切片に接種し、初めてHAVが増殖するのを確かめるとともにアカゲザルの胎児の腎培養細胞(7Rhk6)でも増殖することを発見した。その後世界各地でいろいろな培養細胞を用いて追試された結果、原発性肝癌由来の培養細胞(Alexander hepatoma cell)(Prossner, G. G. et al., Infection 7, 303, (1979))、Vero細胞(Locarnini, S. A. et al., J. Virol., 32, 216, (1981))、アフリカミドリザル腎初代培養細胞(Dacner, R. J. et al., Infect. Immun., 32, 388, (1981))などでも増殖することが確かめられた。本発明者らは、アフリカミドリザル

腎培養細胞よりコロニー培養法によるクローニングによって樹立されたHAV高産生細胞株GL-37細胞と、同じくA型肝炎患者の糞便より分離しGL-37細胞に感受性のすぐれているHAV株KRM003株を用いた組織培養により、大量にHAVを得ることができた。

上記の方法により得られたHAVは、ポリエチレングリコール分画、超遠心、有機溶媒処理、酵素処理、ゲルろ過等の生物学的活性物質の分離精製に用いられる方法の組合せにより、高度に精製して精製製品とし、ホルマリンにて不活化した後、本発明の凍結乾燥ワクチン製剤化に供する。

得られた不活化HAV抗原精製製品を用い凍結乾燥に供するには、中性付近の適当な濃度のバッファ(例えば0.01Mリン酸バッファ)中で、また好ましくはTween 80を0.002V/V%になるよう添加したバッファ中で、HAVおよび各添加物質の組成が次のようになるよう調整される。

すなわち、HAV抗原は蛋白質濃度として0.05V/V%以下、好ましくは0.002V/V%以下含有される。添加される安定化剤としては、アミノ酸類および糖類

の一方または好ましくは双方が含まれる。アミノ酸類としてはグリシン、アラニン、グルタミン酸、ナトリウム、アルギニン、リジンなどのアミノ酸またはそれらの塩が挙げられ、それらの1種もしくは2種以上を用い、通常0.1~2.0M/V%程度、凍結乾燥に供するHAV抗原含有液中に存在させる。

糖類としては、グルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトースなどの単糖類、ラクトース、マルトース、サッカロースなどの二糖類、マンニット、ソルビット、キシリットなどの糖アルコール類が挙げられ、これらの1種もしくは2種以上を用い、通常0.1~15M/V%程度存在させる。また、膠質剤としてはゼラチン、ヒトアルブミン、デキストランなどが挙げられ、通常0.01~0.1M/V%程度存在させる。

さらに凍結乾燥ワクチンの使用時、溶解した際に生理的に等張となるようにするため中性塩を添加する。中性塩としては塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムが含まれるが、好ましくは塩化ナトリウムでこれに適宜、上記他の中性

さらに詳細に説明する。

参考例1 HAVの培養

GL-37細胞を10V/V%牛血清添加イーグル-MEM培地で7日間培養し、細胞シートを形成させる。0.01Mリン酸バッファーで洗浄後、0.05M/V%トリアシン、0.02M/V% EDTA添加0.01Mリン酸バッファーにて細胞をはがし、牛胎児血清（以下FBSと略称する。）を添加し、1000rpmで3分間遠心してトリアシン溶液を除く。細胞沈査を8V/V% FBS添加E-MEM培地にて浮遊させ、この浮遊液にM.O.I.（細胞当りのウイルス感染価）0.1になるように種ウイルス液を感染させ、37℃1時間吸着後8% FBS添加E-MEM培地を加えて3~4倍拡張し、3週間培養する。

この間1週間に1回、2V/V% FBS添加E-MEM培地にて培地交換を行う。3週間後、培地を吸引除去し、続いて0.01Mリン酸バッファーにて2回細胞を洗浄後、1V/V% NP-40（半井化学社製）を含む可溶化液をローラーボトル1本（容量約2ℓ）当たり15ml加え37℃1時間反応させ、HAV感染細胞を可溶化する。可溶化液を3000rpm 30分間遠心し、上清を集める。

塩が添加される。これらの中性塩は0.1~3M/V%程度、通常0.5~2M/V%程度の濃度で含まれる。凍結乾燥に供すべく調製されたワクチン液は、所要の包装単位に従い適宜0.1μg~10μgのHAV抗原を含むように小分容器に分注する。この分注液は、急速凍結乾燥または緩速凍結乾燥し、凍結乾燥製剤とする。凍結乾燥の条件としては、例えば-50℃、常圧にて予備凍結を6時間行い、次に圧力を0.008 Torrに下げ、設定温度を-15℃から0℃に段階的に上げ、50時間1次乾燥を行う。この時点での製品温度は0℃程度である。次に25℃設定温度にて圧力0.008 Torrで20時間2次乾燥を行う。

この凍結乾燥製剤は、その組成として少なくとも組織培養由来HAV抗原、安定化剤、中性塩を含有する。

かくして得られた製剤は、力価の低下がなく、その保存安定性がよく、使用時の溶解性が速やかで極めて優れたA型肝炎ワクチンの凍結乾燥製剤である。

以下、本発明の効果を実施例及び参考例により

この上清液にはHAV抗原が3~6μg/mlの濃度で含まれている。

参考例2 HAVの精製

上記上清液に最終濃度が7M/V%になるようにポリエチレングリコール6000（和光純薬社製）を加えて4℃に置く。一夜後にこのポリエチレングリコール添加溶液を8000rpmで30分間遠心し上清を捨て、沈査に1V/V% NP40を含む可溶化バッファーを加えて再懸濁し、HAV抗原を回収する。さらに、このHAV抗原液を25000rpm 16時間遠心し上清をすて、開始時の1/5~1/10量の0.01Mリン酸バッファーを加えて沈査を完全に再溶解し、4℃に一夜置く。次に超音波処理し、15000rpm 15分間遠心後上清を集める。この上清には通常15~60μg/mlのHAV抗原が含まれる。この上清に等量のクロロホルムを加え室温で15~30分間抽出処理する。2000rpm 30分間遠心し、上層にある水溶液を集め軽く攪拌しながら減圧脱気して残存するクロロホルムを除く。

さらに終濃度で20μg/mlのRNaseA（シグマ社製）を加え、37℃、1時間処理し、次に5M塩化マグネ

シウムと20~40 μ g/ ml のDNase I (宝酒造社製)を加えて37℃で3時間処理する。その後、50 μ g/ ml になるようProteinase K (メルク社製)を加えてさらに37℃、1時間処理する。2.5Mリン酸バッファー pH 7.5、エトキシエタノールとブトキシエタノールの2:1混液をそれぞれ1容及び0.8容加え軽く混和し、2000rpm 10分間遠心し中間層をとり、2mM EDTA、0.002% Tween 80 (和光純薬社製)添加0.01Mリン酸バッファー (pH 7.4)で200~300 μ g/ ml の抗原濃度になる様に溶解する。この有機溶媒処理操作を1~2回繰り返す。この溶液をセファクリル 3400HR (ファルマシア社製)によるゲルろ過により最終精製抗原液を得る。最終精製抗原液は50~100 μ g/ ml の濃度であり、TCA (トリクロロ酢酸)ローリー法にて測定した全蛋白質量に対するHAV抗原蛋白質量の割合は90~100%を示す。

参考例3 不活化

精製ウイルス液を0.002V/V Tween 80及び0.14M塩化ナトリウム添加0.01Mリン酸バッファー (pH 7.5)にてウイルス濃度が20 μ g/ ml になるように希釈

して無菌ろ過する。0.002V/V Tween 80添加0.01Mリン酸バッファー (pH 7.5)を用い1:2000希釈したホルマリンと等量混合し37℃に12日間置く。途中8日目と12日目終了後に再度無菌ろ過する。不活化を完了したウイルス液は4℃に保存する。

参考例4 凍結乾燥

参考例3で調製した不活化精製抗原液に、アミノ酸として0.1M/Vxアルギニン塩酸塩と0.1M/Vxグルタミン酸ナトリウムを、糖として5M/Vxラクトースと1M/Vxソルビットを添加してHAV抗原が最終的に1 μ g/ ml の濃度になるように0.002M/Vx Tween 80添加0.01Mリン酸バッファー (pH 7.5)にてワクチン液を調製した。このワクチン液0.5 ml を2 ml バイアルに入れ、-50℃常圧にて6時間予備凍結後圧力を0.008Torrに下げ、設定温度を-15℃から0℃に段階的に上げて50時間1次乾燥し、次いで25℃にて圧力0.008Torrで20時間2次乾燥して凍結乾燥品を得る。

実施例1

参考例3で調製した不活化精製抗原液を液状にて37℃における保存安定性試験を実施した。溶液

中のHAV抗原の力価をELISA法により測定し、調製後の抗原力価を1とした時の抗原力価の相対値で示した。結果を第1表に示す。

第1表

溶液組成	抗原力価変化			
	3日後	5日後	7日後	11日後
PBS-T	0.91	0.77	0.69	0.60
PBS-T+0.01M/Vxチメロサル	0.26	0.09	0.04	-
PBS-T+2mM EDTA+0.01%チメロサル	0.87	0.56	0.44	0.27

PBS-T: 0.002V/V Tween 80, 0.14M塩化ナトリウム添加0.01Mリン酸バッファー (pH 7.5)

実施例2

参考例3で調製したワクチン液を2 ml バイアルに0.5 ml ずつ分注し、様々な組成で凍結乾燥を行い、37℃における保存安定性試験を実施した。結果を第2表に示す。

第2表

溶液組成	抗原力価変化		性状		抗原力価変化		
	凍結乾燥前	凍結乾燥後	形状	溶解	3日後	7日後	14日後
① PBS-T	1.00	0.16	×	○	0.02	-	-
② PBS-T+5%ラクトース+0.5%アルギニン+0.5%グルタミン酸ナトリウム	1.00	0.90	○	○	0.87	0.83	0.79
③ ②+0.5%ゼラチン	1.00	0.92	○	○	0.90	0.86	0.80

① PBS-T

② PBS-T+5%ラクトース+0.5%アルギニン+0.5%グルタミン酸ナトリウム

③ ②+0.5%ゼラチン

実施例3

参考例4に記したものと同様の方法によって得られた凍結乾燥品の、保存安定性試験を実施した。凍結乾燥後の抗原力価を1とした時の抗原力価の相対値で示した。結果を第3表に示す。

第3表

保存温度	抗原力価変化					
	1週間後	3週間後	5週間後	9週間後	13週間後	17週間後
25℃	0.99	1.15	0.98	1.16	1.12	NT*
37℃	0.91	0.90	0.84	0.80	0.75	0.64
45℃	0.90	0.63	0.62	0.60	0.54	NT*

* not tested

実施例 4

参考例 3 で調製したワクチン原液と参考例 4 で調製した凍結乾燥ワクチンを DDY マウスを用いて免疫原性を比較した。HAV 抗原量 200 ng、100 ng、50 ng、25 ng の接種量で各 10 匹ずつの DDY マウス腹腔内に接種した。6 週間後採血し、その血漿について、抗 HAV 抗体価を HAV 抗原プレートとパーオキシダーゼラベル抗 HAV ウサギ血清を用いた競合抑制 ELISA 法により測定した。その結果を第 4 表に示す。

各抗原量接種における原液接種の場合の平均抗体価を 1 としたときの凍結乾燥ワクチン接種の場合の平均抗体価の相対値の平均で示した。

第 4 表

	相対力価	範囲(95%)
原 液	1.00	
凍結乾燥ワクチン	1.24	0.57~2.83

代理人 弁護士 筒井



第 1 頁の続き

⑦発 明 者	佐 藤	征 他	新潟県新津市秋葉 3-18-5
⑦発 明 者	森 田	迪 夫	千葉県千葉市千城台東 1-10-4
⑦発 明 者	水 野	喬 介	熊本県熊本市龍田町上立田 1725-1